

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870006

研究課題名(和文) 生体超分子構造解析を可能にする表面修飾技術応用コヒーレントX線回折顕微法の開発

研究課題名(英文) Development of surface modification techniques for coherent X-ray diffraction imaging of in-solution biological samples.

研究代表者

木村 隆志 (Kimura, Takashi)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50531472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新世代のX線光源であるX線自由電子レーザーとコヒーレントX線回折顕微法を組み合わせ、溶液中試料イメージング技術の高度化を目指した。電子ビームリソグラフィ法を利用して、試料ホルダとなる窒化ケイ素薄膜上に自己組織化単分子膜のドットパターンを作製、30 nmサイズのパターン上へのタンパク質分子の特異的な修飾に成功した。X線自由電子レーザー施設SACLAにおいて溶液中試料の計測実験を行い、試料からのコヒーレントX線回折パターンの計測し、位相回復計算による試料像再構成を行った。

研究成果の概要(英文)：In this research, I developed surface modification techniques in order to advance the potential of in-solution biological sample imaging by X-ray free-electron laser coherent diffraction microscopy. The surface modification technique we developed includes the fabrication of 30-nm-diameter dot pattern with electron beam lithography on 200-nm-thickness silicon nitride membrane which is used as sample holder for coherent diffraction microscopy. On each dot pattern, we successfully mounted protein molecules with the assistance of self-assembled monolayer. Coherent diffraction patterns from such uniquely fabricated samples were obtained at Japanese X-ray free-electron laser facility SACLA (Spring-8 Angstrom Compact free-electron LASer) and the image was reconstructed by using phase retrieval algorithms.

研究分野：X線イメージング

キーワード：X線光学 X線イメージング 超精密加工 X線自由電子レーザー コヒーレント回折イメージング

1. 研究開始当初の背景

リボソームや巨大タンパク質複合体といった生体超分子の構造解析は、生命現象の理解に不可欠である。DNA の二重螺旋構造を明らかにしたように、X 線結晶構造解析は生体試料の高分解能観察に大きな力を発揮する。しかし、分析される試料は結晶化が可能な比較的分子量のものが多く、細胞質基質などの溶液中で有する構造が結晶化の過程で失われてしまうといった問題が存在する。また、X 線照射時に放射線損傷が生じ、試料構造が破壊されてしまうという点も近年大きな問題として挙げられるようになってきている。

こうした中で、2009 年に実用化された新世代の X 線光源である X 線自由電子レーザーの登場は、現状を大きく変えるブレークスルーとなる可能性を秘めている。X 線自由電子レーザーは、 10^{11} photons/pulse 以上の高ピーク輝度でかつ 10 フェムト秒以下の超短パルス幅を持つという、これまでの X 線光源とは隔絶した性質を有している。こうした特徴から、X 線による構造破壊が生じる前の試料の観察が可能であり^[1]、従来の放射線損傷による限界を超える精度での生体試料の観察が可能になると期待され、現在世界中で多くの研究が進められている。^[2]

また非結晶状態の試料を観察する手法として、レーザー光の特徴である可干渉性を利用した新たな X 線顕微イメージング法の研究も行われている。コヒーレント X 線回折顕微法^[3]は、反復的な位相回復計算を利用して非結晶状態の試料イメージングを可能にする手法で、X 線自由電子レーザーによる放射線損傷なしの計測と組み合わせた実験成果が幾つかのグループで報告されている。^[4]

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、X 線自由電子レーザーによる計測と、コヒーレント X 線回折顕微法を組み合わせ、生体試料などの溶液中に存在する対象物の高分解能イメージング法の開発を行ってきた。X 線自由電子レーザーのフェムト秒のパルス幅は、試料のブラウン運動や分子振動といった動きの時間スケールよりも高速であるため、電子顕微鏡などで一般的に必要な化学処理などの固定化処理をすることなく、溶液中の試料をそのまま、自然に近い状態で観察することが可能である。この原理を利用して、これまでに自己組織化ナノ粒子集合体の液中における構造や生きた細菌の高分解能イメージングに成功している。^[5, 6]

本研究提案では、溶液中に存在する生体超分子などの効率的なイメージングの実現を目指して、生体分子修飾技術を応用したコヒーレント X 線回折顕微法の高度化に取り組んだ。

3. 研究の方法

以下の開発項目の実施を通じて、研究目的の達成に向けて研究を進めた。

- (1) 電子ビームリソグラフィによる溶液試料ホルダ上パターンの作製
- (2) パターンへの自己組織化単分子膜の形成
- (3) 生体分子修飾用末端官能基の付加
- (4) X 線自由電子レーザーを使用したコヒーレント X 線回折顕微法実験

4. 研究成果

- (1) 電子ビームリソグラフィによる溶液試料ホルダ上パターンの作製

コヒーレント X 線回折顕微法実験時に、溶液試料ホルダとして使用する窒化ケイ素の薄膜の上に、電子ビームリソグラフィを用いて金属の微小パターンを作製した。図 1 に溶液試料ホルダの構造図を示す。実験には北海道大学オープンファシリティ所有の電子ビームリソグラフィ装置(ELS-F125-U エリオニクス社製)を使用した。窒化ケイ素薄膜は、溶液試料ホルダの入射・散乱 X 線の透過窓としての役割を担っている。この窒化ケイ素薄膜は、薄膜自体の吸収・散乱を低減するために、厚さが 200 nm 以下と薄くなっている。レジストのコーティング・現像、金属膜のリフトオフ時に高周波数の超音波洗浄装置を使用するなど、加工プロセスを最適化することによって、およそ 30 nm の金属ドットパターンの作製に成功した。

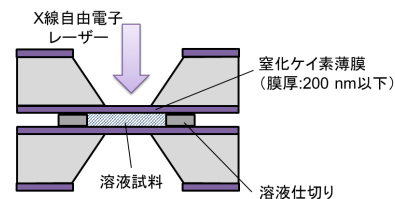


図 1 X 線回折顕微法用溶液試料ホルダ構造の概略図

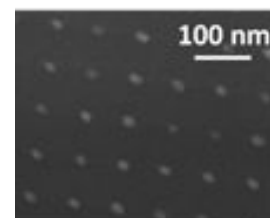


図 2 電子ビームリソグラフィ装置で作製した窒化ケイ素薄膜上の金属ドットパターン

(2) パターンへの自己組織化単分子膜の形成
電子ビームリソグラフィで作製した金属パターン上に生体試料を修飾するために、ドットパターン上への自己組織化単分子膜の形成を試みた。自己組織化単分子膜とは、金属表面などに自己組織化によって分子が自発的に配向した膜のことであり、バイオチップなど、幅広い分野への応用がなされている。自己組織化単分子膜としては、Au 表面上に形成されるアルカンチオール単分子膜が利用されることが多いが、研究代表者らは散乱 X 線への影響、単分子膜の密度・安定性の観点から、 Al_2O_3 とホスホン酸誘導体の自己組織化単分子膜を利用した。

オージェ電子分光装置 (JAMP-9500F 日本電子社製) により、作製したホスホン酸自己組織化単分子膜の評価を行い、想定通り電子ビームリソグラフィで作製した Al ドットパターン上にのみ、選択的にホスホン酸誘導体の分子を吸着できていることを確認した。

(3) 生体分子修飾用末端官能基の付加

パターン上に生体分子を修飾させるためには、自己組織化単分子膜の最表面に生体試料と特異的に結合する官能基を付加する必要がある。生体分子の結合に利用される末端官能基にはアミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基などがあるが、我々はより特異的かつ強力に結合させることが可能な、Ni-NTA 分子やビオチン分子を利用した。Ni-NTA 分子の修飾には、アミノ基末端のホスホン酸誘導体 (11-AUPA 同仁化学研究所社製) を利用し、Al ドットパターン上に単分子膜を形成させた後、イソチオシアノベンジル-NTA を使用し、単分子膜末端に Ni-NTA 分子を導入した。またビオチン分子の際は、ホスホン酸誘導体の末端に、ビオチン分子が既に修飾されているもの (Biotin PA-SAM Formation Reagent 同仁化学研究所社製) を利用した。

末端官能基の評価には、蛍光顕微鏡および高速原子間力顕微鏡を利用した。蛍光顕微鏡による評価の際には、フォトリソグラフィを利用して作製した $1\ \mu\text{m}$ のドットパターン上に、蛍光ラベルを付加したタンパク質 (Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate Life Technologies 社製) を観察した。その結果、図 3 に示すようにドットパターン上のみ特異的に蛍光シグナルが観察され、タンパク質分子をパターン上のみ選択的に修飾可能なことが確認できた。

また、電子ビームリソグラフィにより作製した微小パターンへの生体分子の修飾も試みた。溶液中における生体分子のパターン上への付着状況を確認するため、高速原子間力顕微鏡 (NANOEXPLORER 生体分子計測研究所社製) を使用して計測を行った。図 4 に液中のドットパターンを計測した結果を示す。およそ $10\ \text{nm}$ サイズのタンパク分子がパターン上のみ選択的に修飾されている様子をはっきりと確認することに成功した。

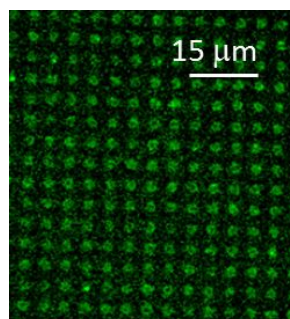


図 3 蛍光顕微鏡で観察したタンパク分子のドットパターン

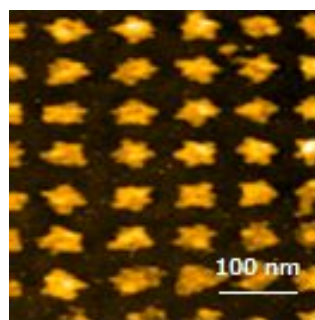


図 4 電子ビームリソグラフィで作製した $30\ \text{nm}$ ドットパターン上に修飾したタンパク分子の高速原子間力顕微鏡像。

(4) X 線自由電子レーザーを使用したコヒーレント X 線回折顕微法実験

生体分子を修飾した溶液試料ホルダを使用して、コヒーレント X 線回折実験を行った。実験は兵庫県佐用郡の X 線自由電子レーザー施設 SACLA において行った。光子エネルギー $4.0\ \text{keV}$ の X 線レーザーを $1.5\ \mu\text{m}$ サイズまで集光し、窒化ケイ素薄膜越しに試料に照射した。試料には、 $100\ \text{nm}$ の四角パターンにリボソームを結合させたものを用いた。図 5 に取得したコヒーレント X 線回折パターンを示す。パターン化した試料に起因する、特徴的な回折パターンが計測されていることが確認できた。一度の X 線照射により窒化ケイ素膜上のパターンは破壊されてしまうため、本データは 1 パルスの X 線レーザーによって計測されている。

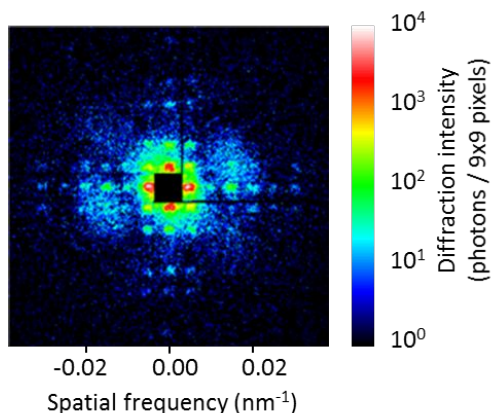


図 5 パターン上試料からのコヒーレント X 線回折パターン

取得したコヒーレントX線回折パターンを元に、位相回復計算によって再構成した試料像を図6に示す。パターン上に就職された生体分子に起因すると考えられる、金属パターンのみの時とは明らかに異なる再構成像が得られた。また、パターン上に試料を修飾することにより、試料と集光X線のヒット率を向上させさせることも確認できた。

現状 1.5 μm サイズの集光ビームを実験に利用しているが、今後 100 nm 程度の集光が可能で、より高性能な X 線集光光学系の使用を計画している。本研究で開発した技術と、より光子密度の高い光学系を組み合わせることにより、液中における生体分子の自然な状態での高分解能イメージングが実現されるものと期待される。

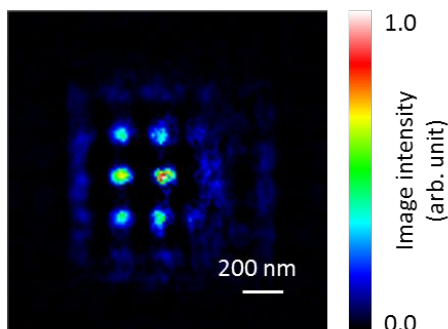


図6 シングルショットコヒーレントX線回折パターンから再構成した試料像

<引用文献>

- [1] R. Neutze *et al.*, “Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses”, *Nature*. **406**(2000), 752.
- [2] H. N. Chapman *et al.*, “Femtosecond X-ray protein nanocrystallography”, *Nature*. **470**(2011), 73.
- [3] J. Miao *et al.*, “Extending the methodology of X-ray crystallography to allow imaging of micrometer-sized non-crystalline specimens”, *Nature*, **400**(1999), 342.
- [4] M. M. Seibert *et al.*, “Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser”, *Nature*. **470**(2011), 78.
- [5] T. Kimura *et al.*, “Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction Takashi”, *Nature. Comm.* **5**(2014) 3052.
- [6] R. Iida *et al.*, “Synthesis of Janus-Like Gold Nanoparticles with Hydrophilic/Hydrophobic Faces by Surface Ligand Exchange and Their Self-Assemblies in Water”, *Langmuir*. **31**(2015) 4054.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

木村 隆志、城地 保昌、別所 義隆、西野 吉則

パルス状コヒーレント X 線溶液散乱法のための溶液試料ホルダの開発、*NanotechJapan Bulletin*, 査読無、Vol. 8、No. 3、2015、pp.1-5

木村 隆志、城地 保昌、別所 義隆、西野 吉則

フェムト秒レーザーによる溶液中の生きた細胞観察、*応用物理*、査読有、Vol. 10、No. 83、2014、pp.830-833

〔学会発表〕(計 14 件)

木村 隆志、後藤 遼平、丸岡 篤史、城地 保昌、大島 泰郎、別所 義隆、西野 吉則、”X 線自由電子レーザーによる溶液中試料ダイナミクス計測の試み”、第 29 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2016/1/09-11、千葉、東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト

T. Sasaki, T. Kimura, Y. Joti, Y. Bessho, Y. Nishino, “Nano-patterning of organic samples for signal enhancement using in X-ray laser diffraction imaging”, The 16th RIES-Hokudai international symposium, 10-11 Nov. 2015, Sapporo, Japan.

木村 隆志、城地 保昌、別所 義隆、西野 吉則、”パルス状コヒーレント X 線溶液散乱法のための溶液試料ホルダの開発”、第 13 階ナノテクノロジー総合シンポジウム、2015/1/30、東京、東京ビッグサイト

T. Kimura, Y. Joti, Y. Bessho, Y. Nishino, “Development of structure analysis method for non-crystallized sample in solution using focused X-ray free-electron laser”, Coherence 2014, 2-5 Sep. 2014, Evanston, USA.

木村 隆志、城地 保昌、別所 義隆、西野 吉則、”超短パルス X 線レーザーによる溶液中試料構造の可視化と応用”、放射光学会第六回若手研究会、2014/8/22-24、兵庫、SPring-8 キャンパス SACL A 実験棟 2 階大会議室

〔その他〕

ホームページ等

<http://cxo-www.es.hokudai.ac.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 隆志 (KIMURA, Takashi)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50531472